

English Abstract for Japanese Patent Publication No. 64-002576:

S5 1 PN="JP 64002576"

?t s5/9/1

5/9/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

007705883

WPI Acc No: 1988-339815/198848

XRAM Acc No: C88-150161

Non-A non-B hepatitis-specific antigenic protein - obtd. by recombinant DNA techniques from liver infected with non-A non-B hepatitis

Patent Assignee: MITSUBISHI CHEM IND LTD (MITU)

Inventor: KAMIZONO M; KITAMURA N; MATSUI R; NAKAANISHI S; TERANISHI Y

Number of Countries: 004 Number of Patents: 008

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 293274	A	19881130	EP 88400790	A	19880331	198848 B
JP 64002576	A	19890106	JP 87140586	A	19870604	198907
JP 1124387	A	19890517	JP 87283990	A	19871110	198926
CN 1031717	A	19890315				199010
US 5032511	A	19910716	US 88168357	A	19880315	199131
EP 293274	B	19910904				199136
DE 3864585	G	19911010				199142
JP 2590885	B2	19970312	JP 87140586	A	19870604	199715

Priority Applications (No Type Date): JP 87283990 A 19871110; JP 8778313 A 19870331; JP 87140586 A 19870604

Cited Patents: 5.Jnl.Ref; EP 190972; EP 66296; EP 92249

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
EP 293274	A	E 33		
JP 2590885	B2	13	C12N-015/09	Previous Publ. patent JP 64002576

Abstract (Basic): EP 293274 A

A DNA fragment is claimed which contains a base sequence coding for a non-A non-B hepatitis-specific antigenic protein occurring in cells of the liver affected with non-A non-B hepatitis. Also claimed is an expression vector in which a DNA fragment contg. a base sequence coding for non-A non-B hepatitis-specific antigen is introduced into a cloning site present downstream from a promoter and transformants obtd. using the vector.

USE/ADVANTAGE - The antigenic protein can be produced with low cost on a large scale. The protein can be used for the in vitro diagnosis of non-A non-B hepatitis. The DNA can also be used as a probe in hybridisation assays for detecting in vitro an infection by non-A non-B hepatitis virus.

0/7

Abstract (Equivalent): EP 293274 B

A DNA fragment which contains a base sequence coding for an antigenic protein specifically occurring in a host affected with non-A non-B hepatitis, said protein comprising the whole or a part of a sequence of 444 aminoacids given in the specification. (45pp)

Abstract (Equivalent): US 5032511 A

DNA fragment that encodes the prodn. of a non-A non-B hepatitis-specific antigenic protein which occurs in liver cells infected with non-A non-B hepatitis, has been isolated. The aminoacid sequence of this antigenic protein has been determined. Expression vectors contg. this DNA fragment at a cloning site downstream from a promoter have been used to transform host cells to produce the antigenic protein. USE - The antigenic protein is a reagent for the rapid diagnosis of non-A non-B hepatitis and for the prodn. of vaccines.

(26pp)

Title Terms: NON; NON; HEPATO; SPECIFIC; ANTIGEN; PROTEIN; OBTAIN; RECOMBINATION; DNA; TECHNIQUE; LIVER; INFECT; NON; NON; HEPATO

Index Terms/Additional Words: DEOXYRIBONUCLEIC; ACID

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/09

International Patent Class (Additional): A61K-039/29; C07H-015/12; C07K-003/00; C12N-001/20; C12N-005/00; C12N-007/00; C12N-015/00; C12P-019/34; C12P-021/02; C12R-001/19; C12N-015/09; C12R-001-91

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B02-V02; B04-B02B; B04-B04A; B12-A01; B12-G02; B12-K04A4; D05-H03B; D05-H04; D05-H06; D05-H07; D05-H12

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M421 M423 M720 M903 N135 Q233 V273 V752 V791
02 M423 M710 M903 Q233 V753

⑯ 日本国特許庁 (JP)

⑰ 特許出願公開

⑮ 公開特許公報 (A)

昭64-2576

⑯ Int.Cl.
C 12 N 15/00
//(C 12 N 15/00
C 12 R 1:91)

識別記号 厅内整理番号
8412-4B

⑯ 公開 昭和64年(1989)1月6日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全13頁)

④発明の名称 DNA断片

⑤特 願 昭62-140586

⑥出 願 昭62(1987)6月4日

優先権主張 ⑦昭62(1987)3月31日 ⑧日本(JP) ⑨特願 昭62-78313

⑩発明者 高橋 和展 神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内

⑪発明者 渋井 達郎 神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内

⑫発明者 内田 みちる 神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内

⑬出願人 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

⑭代理人 弁理士 長谷川 一 外1名

最終頁に統く

明細書

① 発明の名称 DNA断片

② 特許請求の範囲

(1) 非A非B型肝炎発症時の肝細胞内に出現する非A非B型肝炎特異抗原蛋白質をコードする塩基配列を含んで成るDNA断片。

(2) 肝細胞が、ヒト又はテンバンジーの肝細胞であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のDNA断片。

(3) 非A非B型肝炎特異抗原蛋白質が、下記のアミノ酸配列の全部又は一部で示されることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のDNA断片。

Met Ala Val Thr Thr Arg Leu Thr Trp Leu His Glu Lys Ile Leu Gln Asn His Phe Gly Gly Lys Arg Leu Ser Leu Leu Tyr Lys Gly Ser Val His Gly Phe His Asn Gly Val Leu Leu Asp Arg Gys Cys Asn Gln Gly Pro Thr Leu Thr Val Ile Tyr Ser Glu Asp His Ile

Ile Gly Ala Tyr Ala Glu Glu Gly Tyr Gln Glu Arg Lys Tyr Ala Ser Ile Leu Phe Ala Leu Gln Gln Thr Lys Ile Ser Gln Trp Lys Leu Gly Leu Tyr Thr Pro Glu Thr Leu Phe Cys Asp Val Ala Lys Tyr Asn Ser Pro Thr Asn Phe Gln Ile Asp Gly Arg Asn Arg Lys Val Ile Met Asp Leu Lys Thr Met Glu Asn Leu Gly Leu Ala Gln Asn Gys Thr Ile Ser Ile Gln Asp Tyr Glu Val Phe Arg Gys Glu Asp Ser Leu Asp Glu Arg Lys Ile Lys Gly Val Ile Glu Leu Arg Lys Ser Leu Leu Ser Ala Leu Arg Thr Tyr Glu Pro Tyr Gly Ser Leu Val Gln Gln Ile Arg Ile Leu Leu Leu Gly Pro Ile Gly Ala Gly Lys Ser Phe Phe Asn Ser Val Arg Ser Val Phe Gln Gly His Val Thr His Gln Ala Leu Val Gly Thr Asn Thr Thr Gly Ile Ser Gln Lys Tyr Arg Thr Tyr Ser Ile Arg Asp Gly Lys Asp Gly Lys Tyr Leu Pro Phe Ile Leu Gys

特開昭64-2576(2)

Asp Ser Leu Gly Leu Ser Glu Lys Glu Gly
 Gly Leu Cys Met Asp Asp Ile Ser Tyr Ile
 Leu Asn Gly Asn Ile Arg Asp Arg Tyr Glu
 Phe Asn Pro Met Glu Ser Ile Lys Leu Asn
 His His Asp Tyr Ile Asp Ser Pro Ser Leu
 Lys Asp Arg Ile His Cys Val Ala Phe Val
 Phe Asp Ala Ser Ser Ile Glu Tyr Phe Ser
 Ser Glu Met Ile Val Lys Ile Lys Arg Ile
 Arg Arg Glu Leu Val Asn Ala Gly Val Val
 His Val Ala Leu Leu Thr His Val Asp Ser
 Met Asp Leu Ile Thr Lys Gly Asp Leu Ile
 Glu Ile Glu Arg Cys Val Pro Val Arg Ser
 Lys Leu Glu Glu Val Glu Arg Lys Leu Gly
 Phe Ala Leu Ser Asp Ile Ser Val Val Ser
 Asn Tyr Ser Ser Glu Trp Glu Leu Asp Pro
 Val Lys Asp Val Leu Ile Leu Ser Ala Leu
 Arg Arg Met Leu Trp Ala Ala Asp Asp Phe
 Leu Glu Asp Leu Pro Phe Glu Glu Ile Gly
 Asn Leu Arg Glu Glu Ile Ile Asn Cys Ala

Gln Gly Lys Lys ...
 (4) 核酸配列が、下記の塩基配列の全部又は一部で示されることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のDNA断片。

5' ATG GCA GTG ¹⁰ AGA ACT CCT ²⁰ TGT ACG TGG TGA
 CAT GAA ¹⁰ AAG ATG GTG GAA ⁵⁰ AAT CAT TTT GGA
 GGG AAG GGG ⁷⁰ CTT AGG CCT GTC TAT AAG GGT
 AGT GTC GAT ¹⁰⁰ GGA TGC CAT ¹¹⁰ AAT GGA CCT TGA
 CTT GAC ¹³⁰ AGA TGT TGT AAT ¹⁴⁰ GAA GGG CCT AAT
 CTA AGA GTG ATT TAT AGT ¹⁷⁰ GAA GAT CAT ATT
 ATT GGA GCA ¹⁹⁰ TAT GCA GAA GAG GGT TAC ²¹⁰ CAG

GAA AGA AAG ²³⁰ TAT CCT ²³⁰ TGT ATG CCT ²⁴⁰ TTT
 GCA CCT GAA ²⁵⁰ GAG ACT AAA CCT TCA GAA ²⁷⁰ TGG
 AAA CTA CGA CTA TAT AGA CCT GAA AGA CCT
 TTT TGT TGT ³¹⁰ GAC GTT GCA AAA TAT AAG TGG
 CGA ACT AAT ³⁴⁰ CCT CAG ATA GAT CGA AGA ³⁶⁰ AAC
 AGA AAA GTC ³⁷⁰ ATT ATG GAC ³⁸⁰ TTA AAG AGA ³⁹⁰ ATG
 GAA AAT CCT ⁴⁰⁰ GGA CCT CCT GCT CAA AAT TGT ⁴²⁰ ACT
 ATG TGT ATT GAG GAT TAT GAA CCT TTT GGA
 TGG GAA GAT TGA CCT GAG GAA AGA AAG ATA
 AAA CGG CCT ⁴⁹⁰ ATT GAG CCT ⁵⁰⁰ AGG AAC AGC CCT ⁵¹⁰

CTG TGT GCC ⁵²⁰ TTG AGA ACT ⁵³⁰ TAT GAA CGA TAT
 CGA CCT CTG ⁵⁵⁰ GTT CAA CGA ⁵⁶⁰ ATA CGA ATT ⁵⁷⁰ GTC
 GTG CCT GGT CGA ATT CGA CCT CGG AAC ⁶⁰⁰ TGT
 AGG TTT TTC ⁶¹⁰ AAG TCA GTG AGG TGT CCT TTC
 CGA CGG CCT GTA AGG CCT GAT CGG CCT TTG GTG
 CGG ACT AAT ⁶⁷⁰ AGA ACT CGG ⁶⁸⁰ ATA TGT GAG ⁶⁹⁰ AAC
 TAT AGG AGA ⁷⁰⁰ TAC TGT ATT AGA CGC CGG ⁷²⁰ AAA
 GAT CGG AAA TAC CCT CGA CCT TTT ATT CCT TGT
 GAG TCA CCT ⁷⁴⁰ CGG CCT ACT ⁷⁵⁰ GAG AAA CGG CGG
 CGG CCT CCT ⁷⁷⁰ CGG CCT GAT CGC ATA CGG TAC ⁷⁹⁰ ATG

TTG AAG GGT ¹²⁰ AAG ATT GGT ¹³⁰ GAT AGA TAA ¹⁴⁰ CAG
 TTT AAT CGG ¹⁵⁰ ATG GAA TCA ¹⁶⁰ ATG AAA TTA ¹⁷⁰ AAT
 GAT GAT GAG ¹⁸⁰ TAA ATT GAT TCG CCA TOG ¹⁹⁰ GTG
 AAG GAG AGA ²⁰⁰ ATT GAT TGT ²¹⁰ GCA TTT ²²⁰ GTA
 TTT GAT GGC AGG TGT ATT GAA TAA TTO ²⁴⁰ TCG
 TGT CAG ATG ²⁵⁰ ATA GAA ATG AAA AGA ATT
 CGA AGG GAG ²⁶⁰ TTG GTC ²⁷⁰ AAG ²⁸⁰ GGT GTC ²⁹⁰ GTA
 GAT GTC GCT ³⁰⁰ TTG CTC ³¹⁰ ACT GAT GTC ³²⁰ GAT ³³⁰
 ATG GAT ³⁴⁰ CTC ATT ACA ³⁵⁰ AAA GGT GAC GTC ³⁶⁰ ATA
 GAA ATA GAG AGA TGT ³⁷⁰ GTC ³⁸⁰ GGT GTC ³⁹⁰ AGG ⁴⁰⁰ TCG

AAG CTC GAG GAA GTC GAA AGA AAA CTT ¹²⁰ GCA
 TTT GCT GTC TGT GAC ATG TGG GTC GTT ¹³⁰ AAG
 ATT TAT TGG TGT GAG TGG ¹⁴⁰ GAG GTC GAC ¹⁵⁰ CTC
 GTA AAG GAT ¹⁶⁰ GTT CTC ATT CTT TGT GCT ¹⁷⁰ GTC
 AGA CGA ATG ¹⁸⁰ CTC TGG CCT GCA GAT GAG ¹⁹⁰ TCG
 TTA GAG GAT ²⁰⁰ TTG CCT TTT GAG CAA ATA ²¹⁰ GGG
 ATT CTC AGG GAG GAA ATT ²²⁰ ATG AAG TGT ²³⁰ GCA
 GAA GGA ²⁴⁰ AAA ²⁵⁰ AAA ²⁶⁰

(式中、「-」はその上に示された塩基に相補的な塩基を表わす)

2 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、新規なDNA断片に関する。

詳しくは、非A非B型肝炎発症時に特異的にみられる非A非B型肝炎特異抗原蛋白質の遺伝子(C-DNA)を含有するDNA断片に関する。

(従来の技術)

ウイルス性肝炎のうち、A型及びB型についてはそのウイルスが見出され、免疫学的な方法による診断も可能となっている。

しかしながら、A型でもB型でもなく、所謂、非A非B型といわれる肝炎は、細血球肝炎の90%以上を占むるとされている〔日本臨床、J. Clin. : 27(1974), 1977, J. Biol. Med. (ジャーナル・オブ・バイオロジカル・メディシン) 49: 263, 1976〕が、未だ原因ウイルスが同定されておらず、ヒトの非A非B型肝炎がチンパンジーへの感染可能であることが確認されているにすぎない〔Lancet I (ランセフ

ト): 659, 1978. 同: 463, 1978〕。

非A非B型肝炎に関連した抗原抗体系の検索は、多くの研究者によって患者の血清を中心になされているが、まだ明確な系は見出されていない。そのため、非A非B型肝炎の診断は、A型肝炎及びB型肝炎、更には、肝障害を引き起こすことが知られている既知ウイルス、例えば、CMV、EBV、HHV等による肝炎か否かの診断を行ない、それらの肝炎でない場合に非A非B型肝炎と診断する。所用、除外診断法によるため、手間がかかるのが現状である。

本発明者らの一部は、非A非B型肝炎を直接診断に有用な非A非B型抗原蛋白質をヒト及びチンパンジーの肝細胞から精製し、更に、その治療に有用なモノクローナル抗体を作成し、先に提出した(特開昭64-176856号、同64-56196号)。

(発明の解決すべき問題点)

しかしながら、例えば、診断試験として使用

特開昭64-2576(4)

する場合には、多量の非A非B型肝炎特異抗原蛋白質を必要とするが、多量の抗原蛋白質を非A非B型肝炎発症時のテンバンジー等の肝細胞から精製することは必ずしも好適な方法とはいえない。また核酸のハイブリダイゼーションによる非A非B型肝炎特異抗原遺伝子の検出、さらには、組換えDNA技術による非A非B型肝炎特異抗原の生産には、非A非B型肝炎特異抗原蛋白質をコードする遺伝子断片の収得が必須である。

(問題点を解決するための手段)

そこで本発明者らは、該抗原蛋白質を組換えDNA技術により大量に生産すべく試験的を重ね、かかる目的に有用な非A非B型肝炎特異抗原蛋白質をコードする遺伝子を初めて分離取得するに至り、本発明を完成した。

即ち、本発明の要旨は、非A非B型肝炎発症時の肝細胞内に出現する非A非B型肝炎特異抗原蛋白質をコードする核酸配列を含んで成るDNA断片に存する。

Shine S. Cell (セル), 40, 747-755 (1980)によりこれら poly A⁺ RNAに対する cDNAライブラリーを得る。例えば、4塩基程度の任意のプライマーを用い逆転写酵素により上記mRNAに対するcDNAをランダムに合成する。さらにこのcDNAをDNAメチラーゼ(例えばEcoR Iメチラーゼ)によりメチル化し、cDNA中に存在する該制限酵素切断部位を保護した後、両端に該制限酵素切断部位入りDNAリンクター(例えばEcoR Iリンクター(5' GGAATTCC 3'))を付加し、該制限酵素(例えばEcoR I)により消化を行う。

このものをプラスミドあるいはλファージ等のクローニングベクターにクローニングする。例えば発現クローニングベクターであるλgt 11-DNA [Young, R. A. & Pro. Natl. Acad. Sci. USA. (プロシードィングス・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・USA) 80, P1194-1198 (1983)]のEcoR I部位に導入することができる。

以下、本発明を説明するに、本発明の非A非B型肝炎特異抗原蛋白質(以下「本発明の抗原」という。)の遺伝子は、例えば、次のような方法によって得られる。

まず、ヒト又はテンバンジーの非A非B型肝炎発症個体(本発明においては、近年命名された所謂D型肝炎発症個体を含む。)の肝組織をグアニジウムテオシアネット水浴液等中でホモジナイズし、Chirgwinらの方法[Biochemistry (バイオケミストリー) 18, 5294-5299, 1979]に従って、塩化セシウム平衡密度勾配超速心法によって全RNAを沈殿として分離する。分離後、フェノール抽出、エタノール沈殿により全RNAを精製する。

抗原遺伝子のmRNAはpoly A部分を含むことが一般的であることから常法によりこれをオリゴ(A)セルロースカラムクロマトグラフィーにかけ精製し、ポリ(A)含有RNA(poly A + RNA)を単離し mRNA原料とする。このmRNA原料によりランダムプライマー法[Youseke

かかるλgt 11 ファージ内に組み込まれたcDNAはλgt 11 ファージ上のβ-gal'遺伝子の中に組み込まれるので該ファージの大腸菌への感染後 IPTG(インプロビルターカラクトビラノシド)等の物質添改による該ファージ上のラクトースオペロンプロモーターの誘導によりβ-ガラクトシダーゼとの融合タンパク質等として容易に発現が確認される。

この様にして、cDNAが組み込まれたλgt 11 ファージを高沢らの方法(「ベクテリオファージの実験法」99頁~174頁、岩波書店1990年3月20日発行)により大腸菌に感染させ、IPTG等を含む培地で培養する。形成されたplaquesを非A非B型肝炎特異モノクローナル抗体を使用し、免疫スクリーニング等の方法によって選択することにより容易に目的とするcDNAを得ることができる。

この免疫スクリーニング法に使用する抗体は特開昭41-176856号公報、或いは同61-56196号公報に記載されている方法に従い調

特開昭64-2576(5)

盛り立てることができる。スクリーニング法もこれらに記載されているウエスタンプロットティング法で行えばよい。

更に上記免型スクリーニング陽性のブラークから菌液の方法によりファージを増殖させ、そのものから T. Maniatis らの方法 [Molecular Cloning (モレキュラー・クローニング) , Cold Spring Harbor] [Laboratory PP & S (1982)] により DNA を精製し適切な制限酵素例えは Eco RI 等で切断後、Maxam and Gilbert の方法 (Methods in Enzymology 65 , 499-560 (1980)) によって又は制限酵素で切断後、更に M / N ファージにクローンし、Sanger らのジオキシ法 (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74 , 5463 (1977)) によって目的 cDNA セグメントの塩基配列が決定できる。

この様にして非 A 非 B 型肝炎特異抗原をコードする cDNA 断片が得られる。しかしながら、このようにして得られる DNA 断片は、通常非 A 非 B 型肝炎特異抗原をコードする遺伝子の部分

（ドリサーテ） . 2 , 1513 (1979)] に従ってプラスミド DNA を得、適切な制限酵素で切断後、上記の Maxam and Gilbert の方法に上って又は、制限酵素で切断後、更に M / N ファージもしくはプラスミド pVO 12 等にクローンし、上述の Sanger らのジオキシ法によって目的の完全長 cDNA セグメント (4 ~ 5 kb) の塩基配列の決定を行う。

(実施例)

以下の実施例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、その要旨を越えない限り以下の実施例によって限定されるものではない。

実施例 1 非 A 非 B 型肝炎感染チンパンジー肝臓よりのポリ RNA の調製

肝臓よりチオシアン酸アミニジン-塩化リチウム法 [カサラ (Cathala) ら、ディーエヌエイ (DNA) , 2 , 329 (1983)] に従いポリ RNA を有する RNA を下記の如く調製した。

非 A 非 B 型肝炎に感染したチンパンジーより

cDNA 断片として得られる。完全長の cDNA は、上記と同様な方法で poly A⁺ - mRNA を単離、精製し、このものから岡山 - Berg のベクター・プライマーの方法 (Molecular and Cellular Biology 2 , 161-170 , 1982) により cDNA ライブライアリを得る。この様にして調製した cDNA 合成プラスミドを宿す。例えば D. Hanahan の方法 (J. Mol. Biol. (ジャーナルオブモレキュラーバイオロジー) 166 , 557 (1983)) により大腸菌等に形質転換し、アンビシリン耐性株を取得する。この形質転換体を元の部分、DNA 断片をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーション法等によりスクリーニングする。

かかるプローブの作成法としては、ストレプトアビシン法、ホトビオチン核酸および DNA を使用したニックトランスレーション法等が好ましい。

この様にして得られた cDNA クローンを含むコロニーを培養し Birnboim らの方法

[Nucleic Acid Res. (ニューケレイックアシ

感染肝臓を摘出し、直ちに液体窒素にて凍結した。このものを液体窒素とともにワーリングブレンダーに入れ 3,000 r. p. m 3 分間にて粉碎した。このものを 5 mM チオシアン酸アミニジン、10 mM EDTA、50 mM トリス - HCl (pH 7) および 8 % (v/v) β-メルカプトエタノールからなる溶液 1.00 ml 中でテフロンホモゲナイザー (3 rpm) にてさらに破碎し、可溶化した。この可溶化物 3.0 ml を速心管に入っている 5.7 M CsCl 液液 1.0 ml 上に静かにのせ、Hitachi RPS 3 E - フローターにて 27,000 rpm 、30 時間速心後 RNA を沈殿として回収した。この RNA の沈殿を 0.1 % ラクリル硫酸ナトリウム、1 mM EDTA、10 mM トリス - HCl (pH 7.5) からなる溶液 1.0 ml に溶解しフェノール - クロロホルムで抽出後、エタノール沈殿により回収した。得られた RNA 約 3.95 mg を 1.0 mM トリス - HCl (pH 8.0) および 1 mM EDTA からなる溶液 1 ml に溶かした。65 °C 、5 分間インキュベート後 0.1 ml の 5 M NaCl

を加えた。混合物をオリゴ[dT]セルロースカラム[ビー・エル・バイオケミカル(P-L Biochemical)社製]クロマトグラフィー(カラム体積0.5ml)にかけた。吸着したポリ(A)を有するmRNAを10mMトリス-HCl(pH 7.5)および1mMEDTAからなる浴液で溶出し。ポリ(A)を有するmRNA約100μgを得た。

まずポリ(A)mRNA/10μgをRT緩衝液(20mMトリス-HCl(pH 8.8), 0.1M KCl, 1mM MgCl₂, 2mM MnCl₂)50μlに溶かし、ランダムプライマー-d(N)₆[ビー・エル・バイオケミカル(P-L Biochemical)社製]5μgを加え、95℃, 3分間加熱し、変性させた。これを室温まで徐冷し、ランダムプライマーをアニールさせた。この中に10mM dNTP/10μl, 逆転写酵素2.5u(宝酒造社製)を加え。水を加えて計100μlの系とし、37℃で1時間反応させた。

上記反応液50μlを使用し10mMNAD

この中に50mMトリス-HCl(pH 7.5)/1mM Na₂EDTA, 5mMDTT 20μl, 100μM S-アデノシル-L-メチオニン2μl, 1.8μg/ml Eco RI メチラーゼ0.2μlを加え37℃/5分間反応させ。DNA断片上のEco RI 割離酵素切断部位のメチル化を行ないその後70℃, 15分熱処理を行って酵素を失活させた。

次に、3'リン酸化したEco RI リンカー(GGAATTCC)を全合成DNA分子数の100倍になる様に加え、10倍濃度のT₄DNAリガーゼ緩衝液(0.5Mトリス-HCl(pH 7.5), 60mM MgCl₂, 10mMDTT)を5μl加え, 0.1M ATPS 5μl, T₄DNAリガーゼ5μlを加え計50μlの系とし、37℃/1時間反応させた後。70℃, 10分間加熱して酵素を失活させた。次に10倍濃度のEco RI 緩衝液(1.5Mトリス-HCl(pH 7.5), 0.5M NaCl, 60mM MgCl₂)を10μl, Eco RI 100uを加えて計100μlの系とし37℃, 2時

特開昭64-2576(6)

2μl, 10mM dNTP/10μl, RNase H 5u, 大腸菌リガーゼ1u, 大腸菌DNAポリメラーゼI 6.3u, 10倍濃度のT₄DNAリガーゼ緩衝液(0.1Mトリス-HCl(pH 7.5), 0.1M DTT, 60mM MgCl₂)10μlを加え、計100μlの系とし、37℃, 1時間反応させ。2本鎖DNAを合成した。

上記の様にして得た2本鎖DNAを同様の水飽和エタノールで抽出し、エーテルで水層のエタノールを除いた後、エタノール沈殿を行った。

得られた沈殿を50μlの水に溶かし、10倍濃度のT₄DNAポリメラーゼ緩衝液(0.33Mトリス酢酸(pH 7.9), 0.66M酢酸カリウム, 0.1M酢酸マグネシウム, 5mMDTT)10μl, 10mM dNTP/10μl, T₄DNAポリメラーゼ1uを加え、100μlの系とし、37℃/1時間反応させ、2本鎖の平滑末端をもつたDNAを得た。このものを上記したとおり、エタノール抽出し、除タンパクした後、エタノール沈殿を行ってDNAを精製後、風乾した。

間反応させ、余分なリンカーを切除した。さらIC Bio Gel A-50 (0.2cm×32cm)(Bio RAD社製)にこの反応液を通し、10mMトリス-HCl(pH 7.5)4mM MgCl₂緩衝液にて流出し、余分なEco RI リンカーを除去し、Eco RI リンカーの付いた2本鎖cDNAを精製した。

得られたEco RI リンカー付2本鎖cDNA断片を用い、Eco RIで切断した^λgt11DNA 10μgと10倍濃度のT₄DNAリガーゼ緩衝液(前述)10μl, 0.1M ATP/10μl, T₄DNAリガーゼ10uを加え計100μlの反応系で37℃/1時間反応させ^λgt11DNAに上記2本鎖cDNA断片を挿入した。

スマーチバッケージングキット(プロメガ Biotech社製)を用い上記DNAをスマーチ粒子中へ導入した。バッケージングの半ばはキットの説明書に従い行った。

このDNAバッケージングを終了した^λgt11ファージを常法(バクテリオファージ実験法

99頁～174頁、岩波書店/1990年5月30日発行)。皆沢らの法により、大腸菌 λ 1090株に感染させブラークを形成させた。約20万個のブラークより以下に示すような免疫スクリーニング法により陽性のクローン1個を得た。この免疫スクリーニング法に使用した抗体は特開昭61-176856号公報に記載されている方法で調製したものである。

まずIgM/1に感染したY1090 [Young R. M.ら; Proc. Natl. Acad. Sci. USA (プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス USA), 80, 1194-1198 (1983)]を4℃に保溫した上脳軟寒天とともにシャーレに蒼き、4℃に5時間放置した。次に10 mM IPTGを含んだニトロセルロースフィルター(日本社製BA-83ボアサイズ0.2mm)をその上に載せ37℃にて3～4時間培養した。このニトロセルロースフィルターをTBS緩衝液(10 mMトリス-HCl(pH 7.5) 50 mM NaCl)で軽く洗い、35

のTBS緩衝液に浸して行った。発色終了後、フィルターは水でよく洗い水を入れたビニール袋に入れて冷暗所に保存した。

このよう作してポジティブをブラークを1個得た。このポジティブブラークのシングルブラークアイソレーションを行った。これとともに免疫スクリーニングを同様に行いポジティブであることを確認した。

次にこのファージを大筋に培養し、そのDN A を精製した。まずY1090菌をLB培地(LBアミン1.0g, NaCl 5g, 5mM MgSO₄)を水1Lに加え、pH 7.2に調整) 10mlで一晩培養した。このもの1mlに0.01(マルチブリクティオブインフェクション)0.1になる様にファージを感染させ。37℃10分間放置後、LB培地1Lに移し網が溶けするまで7～8時間37℃にて振とう培養を行いクロロホルムエタノールを加え、さらに30分間振とうを続けた。次に菌体強延を6500 r.p.m./10分間の遠心分離により除去し、上清にNaO₁ 20g、ポリエ

特開昭64-2576(ア)

ゼラチンを含むTBS緩衝液400 mlに浸し、40℃1/1時間振とうを行ってニトロセルロースフィルターのプロッキングを行った。次に非 λ 非日肝炎等異抗原に対するモノクローナル抗体(OD₄₅₀ = 4.3)を1mlゼラチンを含むTBS緩衝液に400分の1希釈になるように加え、フィルター1枚につき2mlになる様にピニール袋にフィルターとともにに入れる。室温で10時間反応させた。次に0.05% Tween 20を含むTBS緩衝液400 mlにて10分間3回洗浄し保証 λ 次抗体である抗マウス IgG-PAP(フォースラディッシュベルオキシダーゼ)(バイオ・ラッド社製)を1mlゼラチンを含むTBS緩衝液に1000分の1希釈に加え、フィルター1枚につき2mlになる様にピニール袋にフィルターとともに入れ、室温で2時間反応させ。同様に0.05% Tween 20を含むTBS緩衝液400 mlにて10分間3回洗浄した。発色はフィルターを4-chloro-1-naphthol(バイオラッド社製)1.2mgを過酸化水素水を含む20 ml

テレンクリコール20滴を加えよく溶かしてから4℃で一晩放置した。6500 r.p.m. 20分の遠心分離で沈殿を集め、よく水滴を切り沈殿を20 mM Tris緩衝液(10 mMトリス-HCl(pH 7.5)・5 mM MgCl₂)に落かし DNase I, RNase AをともにIC/10 μg/mlの濃度になる様に加え、37℃1時間反応させた。

次に、20 mlのクロロホルムを加えて攪拌し、ポリエテレンクリコールをクロロホルムに溶解させて水層からとり除去了した。この水層をさらに28000 r.p.m.で60分の超遠心分離にかけファージ粒子のペレットを得た。このペレットを1mlのTM緩衝液にとかし、0.05% 密度勾配遠心(33000 r.p.m. 20時間)により1.1.4S～1.5Sのファージ粒子を含んだ分画を得た。TM緩衝液に對し一晩、透析を行った後、プロテインアーゼKを100 μg/mlになる様加え、37℃で1時間反応させた。その後、同量の水飽和フェノールを加えゆるやかにフェノール抽出を行った。6500 r.p.m. 10分間の遠

心分離の後、本液を取り出し、透析チューブに入れて水に対して 4°C で一晩透析を行った。この様にして、約 5mg のDNAが得られた。

このDNA $100\text{ }\mu\text{g}$ をEco RI $100\text{ }\mu\text{l}$ で前述の緩衝液 $100\text{ }\mu\text{l}$ 中にて 37°C 反応して切断したところ 390 bp と 345 bp のcDNAセグメントがフージDNAに挿入されていることが判明した。この2つのEco RIフラグメントをクローニングベクターであるpUC 119 のEco RI部位に再度クローニングし、ジテオキシ法にて市販のプライマー-CAGGAAACAGCTATG A0およびAGTCGAAGGTTGTA-を用いて天々についてその塩基配列を決定した。2つのDNAの結合部分の塩基配列はこのcDNA断片の内部にあるBam HI、Eco RI部位を同部位に特異的な制限酵素で切断し、得られるBam HI-Eco RI DNAフラグメントをpUC 119 のBam HI-Bma I部位に挿入して同様にジテオキシ法にてそのフラグメントの塩基配列を決定した。該cDNA断片は、図-1に示す通りの塩基配列

収した。Kpn I切断した該DNA約 $200\text{ }\mu\text{g}$ を 40 mM カコジル酸ナトリウム、 30 mM トリス-HCl(pH 6.8)、 1 mM DTTと略記するからなる緩衝液(以下TdT緩衝液と略記する)に加え、さらに 5 M のターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(以下TdTと略記する)(P-L Biochemicals社製)を加えて 37°C 、11分間反応させた。ここでpODV 1 のKpn I切断部位の3末端ボリ(dt)鎖が約 $6\text{ }\mu\text{g}$ 付加された。該溶液からフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿によりボリ(dt)鎖の付加したpODV 1 DNA約 $100\text{ }\mu\text{g}$ を回収した。該DNAを 10 mM トリス-HCl(pH 7.5)、 6 mM MgCl₂および 100 mM NaClからなる緩衝液 $50\text{ }\mu\text{l}$ に加え、さらに 3 M のHpa Iを加え、 37°C 2時間反応させた。該反応物をアガロースグル盤気流助かけ、約 3.1 kDa のD

特開昭64-2576(8)

を有する。これは非A非B型肝炎特異抗原蛋白質をコードする遺伝子の部分cDNA断片であった。

実施例2 完全長の遺伝子を持ったcDNAの取得

実施例1記載の通りにしてmRNAを調製し、岡山ベクターにより常法(Molecular cloning, PP 311, 1982)にてcDNAを合成する。以下cDNAの合成法を記す。

pODV 1 [オカヤマ・アンド・バーグ(Okayama & Berg)] : モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.) , 2, 280 (1983)] $40\text{ }\mu\text{g}$ を 10 mM トリス-HCl(pH 7.5)、 6 mM MgCl₂および 10 mM NaOHからなる溶液 $500\text{ }\mu\text{l}$ に加え、さらに、 $500\text{ }\mu\text{l}$ のKpn I(宝酒造社製、以下序記しない限り制限酵素はすべて宝酒造社製)を加えて、 37°C で4時間反応させ、プラスミド中のKpn I部位で切断した。フェノール-クロロホルム抽出後、エタノール沈殿によりDNAを回

す。断片を分離、回収し、約 $60\text{ }\mu\text{g}$ のボリ(dt)鎖付加pODV 1 を得た。該DNAを 10 mM トリス-HCl(pH 8.0)および 1 mM EDTAからなる溶液 $500\text{ }\mu\text{l}$ に溶解し 5°C 5分間インキュベート後、氷冷して $50\text{ }\mu\text{l}$ の 5 M NaClを加えた。混合物をオリゴ(dA)セルロースカラム(コラボラティブリサーチ社製)クロマトグラフィにかけた。ボリ(dt)鎖長が充分なものはカラムに吸着し、これを 10 mM トリス-HCl(pH 8.0)および 1 mM EDTAからなる溶液で溶出し、ボリ(dt)鎖の付加したpODV 1 (以下ベクタープライマーと略記する)約 5 mg を得た。

次にリンクーDNAの調製を行った。pL [オカヤマ・アンド・バーグ(Okayama & Berg)、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.) , 2, 280 (1983)] 約 $1\text{ }\mu\text{g}$ を 10 mM トリス-HCl(pH 7.5)、 6 mM MgCl₂および 50 mM NaClからなる溶液 $200\text{ }\mu\text{l}$ を加えさらには $50\text{ }\mu\text{l}$ のPst Iを加え、

特開昭64-2576(9)

37°Cで3時間反応させ、pL/DNA中のPstI部位で切断した。該反応物をフェノールークロロホルム抽出後、エタノール沈殿を行い。

PstIで切断したpL/DNA約1.3μgを回収した。該DNA約1.3μgをTdT緩衝液には終濃度0.25mMのdGTPを含む溶液50μLに加え、さらにTdT(P-L Biochemicals社製)5単位を加えて37°C/3分間インキュベートし、pL/³²PPstI切断部位3'末端に(dG)_n鎖を約14個付加した。フェノールークロロホルム抽出後エタノール沈殿にてDNAを回収した。該DNAを10mMトリス-HCl(pH 7.5)、6mM MgCl₂および40mM NaClからなる緩衝液100μLに加え、さらに20uのHindIIIを加えて37°C3時間インキュベートし、pL/DNAのHindIII部位で切断した。該反応をアガロースゲル電気泳動にて分離し、約0.5kbのDNA断片をDEAEペーパー法[ドレツエン(Dretzen)ら、アナリティカル・バイオケミストリイ(Anal. Biochem.) 113, 295

末端に12個の(dG)鎖を付加した。該反応物をフェノールークロロホルム抽出し、エタノール沈殿により(dG)鎖の付加したDNA-ベクタープライマー-DNAを回収した。該DNAを10mMトリス-HCl(pH 7.5)、6mM MgCl₂および40mM NaClからなる液400μLに溶かし、20uのHindIIIを加え、37°C2時間インキュベートし、HindIII部位で切断した。該反応物をフェノールークロロホルム抽出、エタノール沈殿して0.5pmoleの(dG)鎖付加cDNA-ベクタープライマー-DNAを得た。該DNA 0.05pmoleと前記のリンカ-DNA 0.16pmoleを10mMトリス-HCl(pH 7.5)、0.1M NaClおよび1mM EDTAからなる溶液40μLに溶かし、45°C、42°C、0°Cでそれぞれ10分、25分、30分間インキュベートし、20mMトリス-HCl(pH 7.5)、4mM MgCl₂、10mM (NH₄)₂SO₄、0.1M KClおよび0.1mM β-NADの組成で全量400μLとなるよう反応液を調製した。

(1981)にて回収し、オリゴ(dG)鎖付合のリンカ-DNA(以下単にリンカ-DNAと略記する)を得た。

上記で調製したポリ(A)RNA約24μg、ベクタープライマー約1.4μgを50μMトリス-HCl(pH 7.5)、6mM MgCl₂、30mM KCl、0.3mMDTT、1mM dNTP(dATP、dTTP、dGTPおよびdCTP)および10uのリボヌクレアーゼインヒビター(P-L Biochemicals社製)からなる溶液2.3μLに溶かし、10uの逆転写酵素(生化学工業社製)を加え、37°Cで40分間インキュベートし、mRNAに相補的なDNAを合成させた。該DNAをフェノールークロロホルム抽出、エタノール沈殿を行いRNA-DNA二重鎖の付加したベクタープライマー-DNAを回収した。該DNAを6.0μM dGTPおよび0.2μgポリ(A)を含むTdT緩衝液20μLに溶かし、14uのTdT(P-L Biochemicals社製)を加えて37°Cで8時間インキュベートし、cDNA 3'

該反応液に10uの大腸菌DNAリガーゼ(New England Biolabs社製)を加え、11°C一夜インキュベートした。該反応液を各40μMのdNTP、0.15mMβ-NADとなるよう同成分を追加調製し、5uの大腸菌DNAリガーゼ、7uの大腸菌DNAポリメラーゼI(P-L Biochemicals社製)および5uの大腸菌リボヌクレアーゼH(P-L Biochemicals社製)を加え、12°C、25°Cで順次1時間ずつインキュベートした。

上記反応でcDNAを含む組換cDNAの環状化とRNA-DNA二重鎖のRNA部分がDNAに置換され、完全な二重鎖DNAの組換元プラスミドが生成した。

このものを使用し、常法により作成した大腸菌ヨウロウ株のコンピテント細胞を形質転換した。形質転換体約5万個をニトロセルロース上に固定した。これらのコロニーをコロニー・ハイブリダイゼーション法[Molecular Cloning Cold Spring Harbor Laboratory PP J29

(1982)により、常法に従い実施例1で得たcDNA断片を³²P標識してプローブとして用い、スクリーニングした結果、ここで強く会合した3個の陽性なクローンが得られた。

これらのクローンをサザン(Southern)の方法(ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.) 98, 503(1975))により詳しく解析した結果、図2に示す非A非B型肝炎特異抗原蛋白質コードする遺伝子の完全長のcDNAが得られた。

(発明の効果)

大腸菌、枯草菌、酵母、哺乳動物細胞等の公知の宿主中、プロモータを含有する公知の発現制御配列の制御下本発明の非A非B型肝炎特異抗原蛋白質をコードする遺伝子を発現させ。非A非B型肝炎特異抗原を大量に得ることができる。同抗原から得られる抗体は、免疫反応による同抗体の検出に応用される。

また、本発明の非A非B型肝炎ウイルス抗原蛋白質をコードする遺伝子は、核酸ハイブリ

特開昭64-2576(10)

ダイセーションによる同抗原性蛋白質遺伝子の検出のためのプローブとして有用である。

◆ 図面の簡単な説明

図1は、実施例1で得たcDNAの塩基配列を表わす。

図2は、実施例2で得たcDNAの塩基配列を表わす。

図中、第577番から第1783番までが非A非B型肝炎特異抗原蛋白質をコードする塩基配列を表わす。

出願人 三菱化成工業株式会社

代理人 弁理士 長谷川 一

ほか／名

図-1(その1)

250	260	270	280	290	300
CTA GGA CTA TAT ACA CCA GAA ACA CTG TTT TGT TGT GAC GTT GCA AAA TAT AAC TCC CCA					
Leu Gly Leu Tyr Thr Pro Glu Thr Leu Phe Cys Cys Asp Val Ala Lys Tyr Asn Ser Pro					
310	320	330	340	350	360
ACT AAT TTC CAG ATA GAT GGA AGA AAT AGA AAA GTG ATT ATG GAC TTA AAG ACA ATG GAA					
Thr Asn Phe Gln Ile Asp Gly Arg Asn Arg Lys Val Ile Met Asp Leu Lys Thr Met Glu					
370	380	390	400	410	420
AAT CTT GGA CTT GCT CAA AAT TGT ACT ATC TCT ATT CAG GAT TAT GAA GTT TTT CGA TGC					
Asn Leu Gly Leu Ala Gln Asn Cys Thr Ile Ser Ile Gln Asp Tyr Glu Val Phe Arg Cys					
430	440	450	460	470	480
GAA GAT TCA CTG GAC GAA AGA AAG ATA AAA GGG GTC ATT GAG CTC AGG AAG AGC TTA CTG					
Glu Asp Ser Leu Asp Glu Arg Lys Ile Lys Gly Val Ile Glu Leu Arg Lys Ser Leu Leu					
490	500	510	520	530	540
TCT GCC TTG AGA ACT TAT GAA CCA TAT GGA TCC CTG GTT CAA CAA ATA CGA ATT CTG CTG					
Ser Ala Leu Arg Thr Tyr Glu Pro Tyr Glu Ser Leu Val Gln Gln Ile Arg Ile Leu Leu					
550	560	570	580	590	600
CTG GGT CCA ATT GGA GCT GGG AAG TCT AGC TTT TTC AAC TCA GTG AGG TCT GTT TTC CAA					
Leu Gly Pro Ile Gly Ala Gly Lys Ser Ser Phe Phe Asn Ser Val Arg Ser Val Phe Gln					
610	620	630	640	650	660
GGG CAT GTA ACG CAT CAG GCT TTG GTG GGC ACT AAT ACA ACT GGG ATA TCT GAG AAG TAT					
Gly His Val Thr His Gln Ala Leu Val Gly Thr Asn Thr Thr Gly Ile Ser Glu Lys Tyr					

特開昭64-2576(11)

3)

図-1(その2)

670 680 690 700 710 720
 AGG ACA TAC TCT ATT AGA GAC GGG AAA GAT GGC AAA TAC CTG CCA TTT ATT CTG TGT GAC
 Arg Thr Tyr Ser Ile Arg Asp Gly Lys Asp Gly Lys Tyr Leu Pro Phe Ile Leu Cys Asp
 730 740 750 760 770 780
 TCA CTG GGG CTG AGT GAG AAA GAA GGC GGC CTG TGC ATG GAT GAC ATA TCC TAC ATC TTG
 Ser Leu Gly Leu Ser Glu Lys Glu Gly Leu Cys Met Asp Asp Ile Ser Tyr Ile Leu
 790 800 810 820 830 840
 AAC GGT AAC ATT CGT GAT AGA TAC CAG TTT AAT CCC ATG GAA TCA ATC AAA TTA AAT CAT
 Asn Gly Asn Ile Arg Asp Arg Tyr Gin Phe Asn Pro Met Glu Ser Ile Lys Leu Asn His
 850 860 870 880 890 900
 CAT GAC TAC ATT GAT TCC CCA TCG CTG AAG GAC AGA ATT CAT TGT GTG GCA TTT GTA TTT
 His Asp Tyr Ile Asp Ser Pro Ser Leu Lys Asp Arg Ile His Cys Val Ala Phe Val Phe
 910 920 930 940 950 960
 GAT GCC AGC TCT ATT GAA TAC TTC TCC TCT CAG ATG ATA GTA AAG ATC AAA AGA ATT CGA
 Asp Ala Ser Ser Ile Glu Tyr Phe Ser Ser Gin Met Ile Val Lys Ile Lys Arg Ile Arg
 970 980 990 1000 1010 1020
 AGG GAG TTG GTA AAC GCT GGT GTG GTA CAT GTG GCT TTG CTC ACT CAT GTG GAT AGC ATG
 Arg Glu Leu Val Asn Ala Gly Val Val His Val Ala Leu Leu Thr His Val Asp Ser Met
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 GAT CTG ATT ACA AAA GGT GAC CTT ATA GAA ATA GAG AGA TGT GTG CCT GTG AGG TCC AAG
 Asp Leu Ile Thr Lys Gly Asp Leu Ile Glu Ile Glu Arg Cys Val Pro Val Arg Ser Lys

図-1(その3)

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 CTA GAG GAA GTC CAA AGA AAA CTT GGA TTT GCT CTT TCT GAC ATC TCG GTG GTT AGC AAT
 Leu Glu Glu Val Gin Arg Lys Leu Gly Phe Ala Leu Ser Asp Ile Ser Val Val Ser Asn
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 TAT TCC TCT GAG TGG GAG CTG GAC CCT GTA AAG GAT GTT CTA ATT CTT TCT GCT CTG AGA
 Tyr Ser Ser Glu Trp Glu Leu Asp Pro Val Lys Asp Val Leu Ile Leu Ser Ala Leu Arg
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 CGA ATG CTA TGG GCT GCA GAT GAC TTC TTA GAG GAT TTG CCT TTT GAG CAA ATA GGG AAT
 Arg Met Leu Trp Ala Ala Asp Asp Phe Leu Glu Asp Leu Pro Phe Glu Gin Ile Gly Asn
 1270 1280 1290 1300
 CTA AGG GAG GAA ATT ATC AAC TGT GCA CAA GGA AAA AAA TAG
 Leu Arg Glu Glu Ile Ile Asn Cys Ala Gin Gly Lys Lys ***

特開昭64-2576(12)

図-2(その1)

10 20 30 40 50 60 70 80
 5' GGGGGCTAC CCTCAGCTCT AGCTCATACT AGAGACAGTA CAACAGATCA AGAAAGTATGG CAGTGACAAC TCGTTGACA
 3' CCCCCGATG GGAGTCGAGA TCGAGTATGA TGTCTGTCAT GTTGTCTAGT TCTTCATACC GTCACTGTTG AGCAAACGTG
 90 100 110 120 130 140 150 160
 TGGTTGCATG AAAAGATCCT GCAAAATCAT TTGGAGGGAG CAGGGCTTAG CCTTCTCTAT AAGGGTAGTG TCCATGGATT
 ACCAACGTAC TTTCTAGGA CGTTTAGTA AAACCTCCCT TCGCCGAATC GGAAGAGATA TTCCCACATCAC AGGTACCTAA
 170 180 190 200 210 220 230 240
 CCATAATGGA GTTTGCTTG ACAGATGTTG TAATCAAGGG CCTACTCTAA CAGTGATTAA TAGTGAAGAT CATATTATTG
 GGTATTACCT CAAAAACGAAC TGTCTACAAAC ATTAGTTCCC GGATGAGATT GTCACTAAAT ATCACTTCTA GTATAATAAC
 250 260 270 280 290 300 310 320
 GAGCATATGC AGAAGAGGGT TACCAAGGGAA GAAAGTATGC TTCCATCATC CTTTTTGACAC TTCAAGAGAC TAAAATTTC
 CTCTGATACG TCTTCTCCCA ATGGTCTTT CTTTCATACG AAGGTAGTAG GAAAAAACGTG AAGTTCTCTG ATTTAAAGT
 330 340 350 360 370 380 390 400
 GAATGGAAAC TAGGACTATA TACACCAGAA ACACTGTTT GTTGTGACCT TGCAAAATAT AACTCCCCAA CTAATTTCA
 CTTACCTTTG ATCCTGATAT ATGTGGTCTT TGTGACAAAAA CAACACTGCA ACGTTTATA TTGAGGGGTT GATTAAGGT
 410 420 430 440 450 460 470 480
 GATAGATGGA AGAAATAGAA AAGTGATTAT GGACTTAAAG ACAATGGAAA ATCTTGGACT TGCTCAAAT TGTACTATCT
 CTATCTACCT TCTTTATCTT TTCACAAATA CCTGAATTTC TGTTACCTT TAGAACCTGA ACAGAGTTTA ACATGATAGA
 490 500 510 520 530 540 550 560
 CTATTCAAGGA TTATGAAGTT TTTCGATGCG AAGATTCACT GGACGAAAGA AAGATAAAAG GGGTCATTGA GCTCAGGAAG
 GATAAGTCCT AATACTTCAA AAAGCTACGC TTCTAAGTGA CCTGCTTTCT TTCTATTTTC CCCAGTAACG CGAGTCCTTC
 570 580 590 600 610 620 630 640
 AGCTTACTGT CTGCCCTGAG AACTTATGAA CCATATGGAT CCTGGTTCAC ACAAAATACGA ATTCTGCTGC TGGGTCCAAT
 TCGAATGACA GACGGAACTC TTGAATACTT GGTATACCTA GGGACCAAGT TGTTTATGCT TAAGACGACG ACCCAGGTTA

図-2(その2)

650 660 670 680 690 700 710 720
 TGGAGCTGGG AAGTCTAGCT TTTCACACT AGTGAGGTCT GTTTTCAAGG GGCATGTAAC GCATCAGGCT TTGGTGGGCA
 ACCTCGACCC TTCAGATCGA AAAAGTTGAG TCACTCCAGA CAAAGGTTC CCGTACATG CGTAGTCCGA ACCACCCGT
 730 740 750 760 770 780 790 800
 CTAATACAAAC TGGGATATCT GAGAAGTATA GGACATACCT TATAGAGAC GGGAAAGATG GCAAATACCT GCATTTATT
 GATTATGTTG ACCCTATAGA CTCTTCATAT CCTGTATGAG ATAATCTCTG CCCTTTCTAC CGTTTATGGA CGGTAATAAA
 810 820 830 840 850 860 870 880
 CTGTGTGACT CACTGGGGCT GAGTGAGAAA GAAGGGGGCC TGTCATGGA TGACATACCT TACATCTGAG ACGGTAAACAT
 GACACACTGA GTGACCCCCGA CTCACCTTTT CCTCCGGGG ACACGTACCT ACTGTATAGG ATGTAAGACT TGCCATTGTA
 890 900 910 920 930 940 950 960
 TCGTGATAGA TACCAAGTTA ATCCCACATGAA ATCAATCAAAT TAAATCATC ATGACTACAT TGATTCCTCA TCGCTGAAGG
 AGCACTATCT ATGGTCAAAT TAGGGTACCT TAGTTAGTTT AATTTAGTAG TACTGATGTA ACTAAGGGGT AGCGACTTCC
 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
 ACAGAATTCA TTGTGTGGCA TTGTATTTG ATGCCAGCTC TATTGAATAC TTCTCTCTC AGATGATAGT AAAGATCAA
 TGTCTTAAGT AACACACCGT AAACATAAAC TACGGTCGAG ATAACCTTATG AAGAGGAGAG TCTACTATCA TTTCTAGTTT
 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 AGAATTGAA GGGAGTTGGT AAACGCTGGT GTGGTACATG TGGCTTGTCT CACTCATGAG GATAGCATGG ATCTGATTAC
 TCTTAAGCTT CCTCAACCA TTGGCAGCA CACCATGTAC ACCGAAACGA GTGAGTACAC CTATCGTACCTAGACTAATG
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 AAAAGGTGAC CTTATAGAAA TAGAGAGATG TGTGCCTGTG AGGTCCAAGC TAGAGGAAGT CCAAAGAAAA CTTGGATTG
 TTTTCCACTG GAATATCTTT ATCTCTCTAC ACACGSACAC TCCAGGTTCG ATCTCTCTCA GGTTTCTTTT GAACCTAAAC
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
 CTCTTCTGA CATCTCGGTG GTTAGCAATT ATTCCTCTGA GTGGGAGCTG GACCCCTGTAA AGGATGTTCT AATTCTTCT
 GAGAAAGACT GTAGAGCCAC CAATCGTAA TAAGGAGACT CACCCCTCGAC GTGGGACATT TCCTACAAAGA TTAAGAAAGA

特開昭64-2576(13)

図-2(その3)

1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
 GCTCTGAGAC GAATGCTATG GGCTGCAGAT GACTTCTTAG AGGATTTGCC TTTTGAGCAA ATAGGGAATC TAAGGGAGGA
 CGAGACTCTG CTTACGATAAC CCGACGTCTA CTGAAGAACATC TCCTAAACGG AAAACTCGTT TATCCCTTAG ATTCCCTCCT
 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 AATTATCAAC TGTGCACAAG GAAAAAAAATA GATATGTGAA AGGTTCACGT AAATTCCTC ACATCACAGA AGATTAATAAT
 TTAATAGTTG ACACGTGTTG CTTTTTTAT CTATACACTT TCCAAGTGCA TTTAAAGGAG TGTAGTGTCT TCTAATTTA
 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520
 TCAGAAAGGA GAAAACACAG ACCAAAGAGA AGTAACATAAG ACCAAAGGGA TGTGTTTAT TAATGTCTAG GATGAAGAAA
 AGTCTTTCCT CTTTGTGTC -TGGTTCTCT TCATTGATTC TGGTTCCCT ACACAAAATA ATTACAGATC CTACTTCCTT
 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
 TGCATAGAAC ATGTAGTAC TTGTAAATAA CTAGAAATAA CATGATTTAG TCATAATTGT GAAAATAAT AATAATTTC
 ACGTATCTG TAACATCATG AACATTATT GATCTTATT GTACTAAATC AGTATTAACA CTTTTTATTA TTATTAAAA
 1610 1620 1630 1640 1650 1660
 CTTGGATTTA TGTTCTGTAT CTGTGAAAAA ATAATTTCT TATAAAAAAAA AAAAAAAA AAAA 3'
 AACCTAAAT ACAAGACATA GACACTTTT TATTTAAAGA ATATTTTTT TTTTTTTTT TTTTTTTT 5'

第1頁の続き

- ②発明者 紅林 理恵 神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内
- ②発明者 寺西 錠 神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内
- ②発明者 中西 重忠 京都府京都市左京区岩倉長谷町517-116
- ②発明者 喜多村 直美 京都府京都市左京区高野上竹屋町31